

## PENGUNAAN EKSTRAK KOMBINASI ANGKAK DAN DAUN JATI SEBAGAI PEWARNA PENUTUP PADA PEWARNAAN GRAM

Dewi Peti Virgianti, Cindy Luciana  
Program Studi DIII Analisis Kesehatan  
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Tunas Husada Tasikmalaya  
[dewivirgianti@gmail.com](mailto:dewivirgianti@gmail.com)

### Abstrak

Angkak dan daun jati merupakan bahan alam yang dapat digunakan sebagai pewarna alami karena mengandung pigmen berwarna merah. Kandungan pigmen ini dapat dimanfaatkan sebagai alternatif bahan pewarna dalam pewarnaan bakteri, yaitu sebagai pewarna penutup pada pewarnaan Gram. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dapat digunakan sebagai pewarna penutup pada pewarnaan Gram. Ekstrak angkak dan daun jati diperoleh dengan melarutkannya dalam alkohol 96%, kemudian dicampurkan dengan kombinasi ekstrak angkak dan daun jati 2:1 dan dioksidasi dengan kalium permanangat hingga mencapai pH netral. Bakteri uji yang diwarnai adalah bakteri Gram negatif *Escherichia coli*. Dilakukan tiga perlakuan yang berbeda berdasarkan waktu pewarnaan, yaitu perendaman dengan pewarna penutup kombinasi angkak dan daun jati selama 1 menit, 5 menit dan 10 menit. Pengamatan hasil aplikasi penggunaan kombinasi angkak dan daun jati ini dilakukan secara deskriptif meliputi kebersihan lapang pandang, kekontrasan warna dan kesempurnaan bentuk bakteri bila dibandingkan dengan bakteri yang diwarnai dengan menggunakan pewarnaan Gram standar yaitu menggunakan warna penutup *basic fuchsin*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hasil pewarnaan yang cukup baik diperoleh dari perlakuan dengan waktu perendaman pewarna penutup kombinasi angkak dan daun jati selama 10 menit pada proses pewarnaan Gram yang dilakukan, yaitu menunjukkan lapang pandang yang bersih, dan bentuk bakteri yang sempurna dan warna yang cukup kontras meskipun hasil yang diperoleh tidak sebaik pada kontrol. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dapat digunakan sebagai alternatif pewarna penutup pada pewarnaan Gram namun masih memerlukan penelitian lanjutan untuk menyempurnakan formulasinya.

Kata kunci : angkak, daun jati, pewarnaan Gram

### PENDAHULUAN

Di dunia laboratorium khususnya di bidang mikrobiologi, pewarnaan merupakan salah satu bagian terpenting. Pewarnaan berfungsi untuk memudahkan melihat bakteri dengan menggunakan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, untuk melihat struktur luar dan struktur dalam bakteri seperti dinding sel vakuola, menghasilkan sifat-sifat dan kimia yang khas bakteri dengan zat warna, serta meningkatkan kontras mikroorganisme dengan sekitarnya (Pelczar & Chan, 2009). Pewarna bakteri yang biasa digunakan yaitu pewarna

sintetis diantaranya *safranin*, *carbol fuchsin*, *crystal violet*, dan *methylen blue*.

Di Indonesia, bahan pewarna alami banyak digunakan seperti dari bahan alam berupa tanaman yang mengandung antosianin baik bagian bunga, daun, batang, ataupun akar. Aplikasi penggunaan pewarna alami diantaranya yaitu sebagai pewarna alami pada makanan dan tekstil. Pewarna alami yang dapat diaplikasikan pada makanan diantaranya yaitu buah naga (Ekawati *et al*, 2015), kulit manggis (Farida & Nisa, 2015), kunyit (Syarfi, 2012) dan ubi jalar (Winarti *et al*, 2008). Sedangkan pewarna alami yang dapat diaplikasikan sebagai

pewarna tekstil yaitu daun jati (Rosyida & Achadi, 2014).

Selain digunakan sebagai pewarna makanan dan tekstil, pewarna alami dari bahan alam dapat pula digunakan sebagai pewarna pada proses pewarnaan bakteri. Penelitian pewarna alami yang digunakan pada pewarnaan bakteri dilakukan oleh Hafizet al (2012) yang menggunakan ekstrak daun henna sebagai pewarna penutup pada pewarnaan Gram.

Bahan alam yang berpotensi untuk digunakan sebagai pewarna pada bakteri sangatlah banyak, diantaranya terdapat angkak dan daun jati yang menghasilkan pigmen warna merah.

Penelitian Ati (2006) menyatakan bahwa ekstrak daun jati ini memiliki kandungan antosianin, jenis pelargonidin, sebagai pigmen alaminya. Pelargonidin merupakan golongan pigmen antosianidin, yaitu aglikon antosianin yang terbentuk bila antosianin dihidrolisis dengan asam. Kandungan ini berfungsi sebagai pembentuk warna (pemberi pigmen) yang menyebabkan ekstrak daun jati berwarna merah darah.

Begitu juga dengan angkak atau biasa disebut dengan beras merah cina. Angkak sendiri merupakan produk dari beras yang difermentasikan oleh jenis kapang *Monascus anka* / *Monascus purpureus* (Wijayakusuma, 2008). Menurut Suwanto (1985) dan Ma et al (2000) pada angkak terdapat pigmen berwarna merah yaitu *rubropunktatin* dan *monaskorubin*.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Luciana (2016), bahwa kombinasi ekstrak angkak dan daun jati 2:1 dapat digunakan sebagai pewarna bakteri pada pewarnaan sederhana, yaitu dapat memberikan hasil pewarnaan yang cukup baik pada parameter yang diukur meliputi kejelasan lapang pandang, kontras warna dan kesempurnaan bentuk bakteri yang diwarnai. Berdasarkan hasil tersebut maka aplikasi penggunaan ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dapat pula digunakan pada jenis pewarnaan lainnya pada bakteri, yaitu pewarnaan Gram.

## **BAHAN DAN METODA**

### **Alat dan Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah angkak, daun jati muda, alkohol, akuades, kertas saring, minyak imersi, Strain *Escherichia coli* ATCC 25922 ATCC 25922 yang diperoleh dari Lab Mikrobiologi Prodi DIII Analis Kesehatan STIKes BTH, kristal violet, lugol, alkohol 96%, *basic fuchsin*, kalium permanangat 0,1N dan kertas tissue. Sedangkan alat yang digunakan adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, corong, mortar, alu, batang pengaduk, ose bulat, neraca digital, rak pewarnaan, penjepit, lampu spiritus, kaca objek, kaca arloji, gelas kimia.

### **Metode penelitian**

Pengamatan hasil penelitian dilakukan secara deskriptif yaitu dengan mengamati hasil pewarnaan yang dihasilkan dari aplikasi penggunaan

ekstrak kombinasi angkak dan daun jati sebagai pewarna penutup pada pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan tersebut dibandingkan dengan kontrol. Parameter yang diamati meliputi kejelasan lapang pandang, kontras warna dan kesempurnaan bentuk bakteri yang diwarnai.

### Prosedur Kerja Penelitian

1. Preparasi sampel menurut Hafizet al (2012) dengan modifikasi:

Larutan stok angkak dan daun jati dibuat dengan menimbang angkak sebanyak 1 Gram dan daun jati muda sebanyak 1 Gram. Masing-masing dimasukkan ke dalam wadah yang berbeda dan dilarutkan dalam alkohol 96% sebanyak 2 mL. Setiap larutan yang dibuat tersebut dipipet dicampurkan ke dalam satu wadah dengan komposisi larutan angkak sebanyak 2 mL dan larutan daun jati sebanyak 1 mL sehingga didapatkan ekstrak kombinasi angkak : daun (2 : 1).

Kedua larutan dihomogenkan dan disaring menggunakan kertas saring. Kemudian ke dalam larutan tersebut ditambahkan kalium permanangat sebagai oksidator sampai pH larutan menjadi netral.

2. Pewarnaan Gram (Harley & Prescott, 2002).

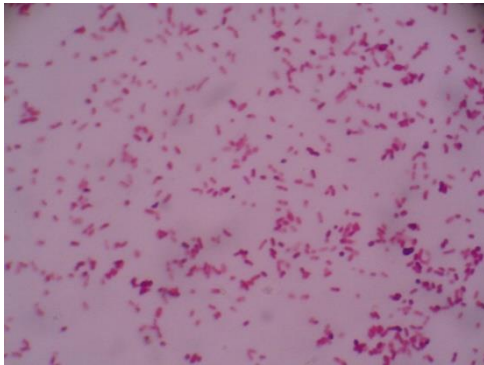
Dibuat apusan bakteri pada kaca objek. Bakteri diambil dari koloni biakan murni *Escherichia coli* pada media Agar Nutrien. Setelah difiksasi, apusan tersebut digenangi dengan Kristal

violet dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah bersih digenangi dengan lugol selama 1 menit, kemudian dicuci dengan alkohol 96%. Kemudian digenangi dengan larutan penutup (*carbol fuchsin* sebagai kontrol) dan larutan ekstrak kombinasi angkak dan daun jati sebagai perlakuan penelitian. Waktu yang digunakan untuk kontrol adalah 1 menit, sedangkan untuk perlakuan penelitian selama 1 menit, 5 menit dan 10 menit. Tahapan akhir pewarnaan dengan membilas apusan dengan air mengalir kemudian dikeringkan di udara. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran lensa objektif 100X.

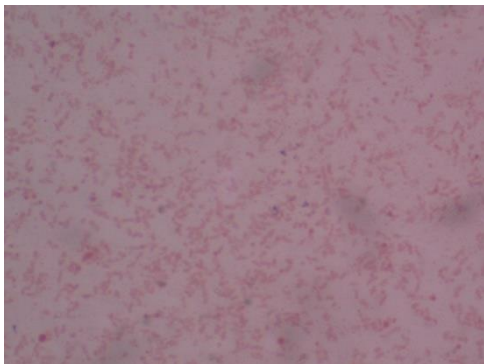
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan hasil pewarnaan yang berbeda dari setiap perlakuan lama pewarnaan yang dilakukan pada perendaman menggunakan pewarna penutup ekstrak kombinasi angkak dan daun jati. Dilihat dari parameter kejelasan lapang pandang dan kesempurnaan bentuk bakteri terlihat sama pada semua perlakuan 1 menit, 5 menit dan 10 menit, yaitu lapang pandang terlihat jelas dan mempunyai bentuk bakteri yang sempurna berbentuk batang. Sedangkan untuk parameter kontras warna terlihat bervariasi, yaitu pada waktu pewarnaan 1 dan 5 menit terlihat kurang kontras sedangkan pada waktu pewarnaan 10 menit terlihat cukup kontras bila

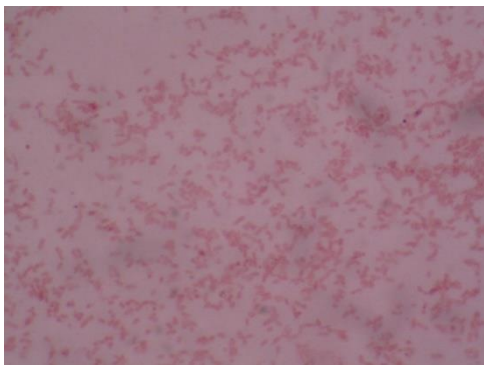
dibandingkan dengan hasil pewarnaan kontrol yang terlihat kontras.



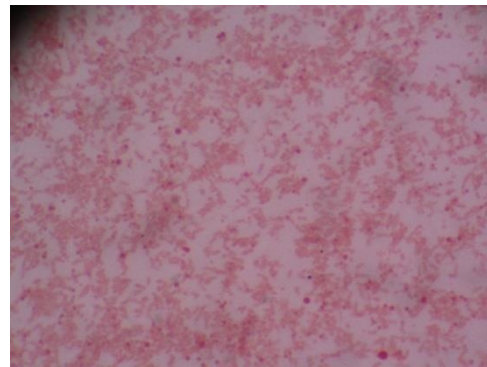
Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram dengan warna penutup *carbol fuchsin* (kontrol).



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram dengan warna penutup ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dengan lama pewarnaan selama 1 menit.



Gambar 3. Hasil pewarnaan Gram dengan warna penutup ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dengan lama pewarnaan selama 5 menit.



Gambar 4. Hasil pewarnaan Gram dengan warna penutup ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dengan lama pewarnaan selama 10 menit.

Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri berdasarkan grupnya yaitu Gram positif dan Gram negatif yang berbeda dalam komposisi dinding sel nya. Pewarna yang digunakan terdiri dari pewarna utama dan pewarna penutup. Pewarna utama yang digunakan pada pewarnaan Gram yaitu kristal violet yang berwarna ungu. Pelekatan pewarna utama pada sel bakteri lebih ditingkatkan dengan penambahan mordant (Harley&Prescott, 2002). Terjadi mekanisme yang berbeda pada bakteri Gram positif dan Gram negatif ketika ditambahkan larutan peluntur, pada bakteri Gram positif warna akan dipertahankan tetapi pada Gram negatif akan hilang. Oleh karena itu diperlukan pewarna penutup yang kontras untuk mewarnai bakteri Gram negatif, yaitu dengan pewarna yang berwarna merah.

Pewarna penutup yang sering digunakan pada pewarnaan Gram adalah *basic fuchsin* atau safranin. Pada penelitian ini dilakukan pengujian angkak dan daun jati, untuk aplikasinya sebagai pewarna penutup. Angkak atau beras

merah cina adalah salah satu bahan yang biasa digunakan sebagai pewarna, warna yang dihasilkan oleh angkak adalah warna merah. Warna merah ini stabil dalam berbagai pH dan mudah larut dalam pelarut polar (Radiastuti, 2005), selain itu angkak juga mudah ditemukan, karena angkak banyak di jual di pasaran. Selain angkak, daun jati muda juga bisa digunakan sebagai pewarna, warna yang dihasilkan adalah warna merah yang dihasilkan dari antosianin (Pratama, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian Luciana (2016) bahwa angkak dapat memberikan warna merah terhadap bakteri tetapi bentuk bakteri yang didapat tidak jelas sedangkan hasil yang didapat pada penggunaan daun jati muda, bakteri tidak optimal terwarnai tetapi bentuk bakteri terlihat jelas. Maka formula yang menggunakan kombinasi angkak dan daun jati muda lebih baik digunakan dalam pewarnaan bakteri.

Pada penelitian ini digunakan larutan alkohol 96% sebagai pengekstrak angkak dan daun jati muda yang bertujuan untuk menarik zat warna yang terkandung di dalam sediaan bahan alam tersebut agar lebih optimal digunakan. Ketika stok pewarna angkak dan daun jati sudah dibuat perbandingan, terhadap larutan stok tersebut ditambahkan kalium permanganat sampai pH nya mencapai netral (pH 7). Penambahan kalium permanganat tersebut didasari oleh hasil penelitian (Hafizet al, 2012) yang menyatakan bahwa pewarna alami harus dioksidasi terlebih dahulu. Berdasarkan penelitian tersebut

dinyatakan bahwa kalium permanganat adalah oksidator yang paling bagus digunakan dibandingkan dengan *hydrogen peroxide*, *ferric chloride*, dan *potassium alum*.

Penambahan  $KMnO_4$  pada substrat yang dilarutkan pada pelarut organik mempunyai mekanisme oksidasi yang salah satu kemungkinannya adalah dengan cara disosiasi kompleks pasangan ion (Dash et al, 2009). Mekanisme pada pewarnaan bakteri oleh zat alami yang dioksidasi oleh kalium permanganat diduga terjadi karena adanya disosiasi kompleks pasangan ion zat warna dan kalium permanganat menjadi kompleks kation kalium dan  $MnO_4^-$  yang menjadi anion. Komplek kation kalium dengan zat warna tersebut menunjukkan adanya ion bermuatan positif, sehingga memiliki sifat dapat terikat pada komponen sel yang bermuatan negatif. Sel bakteri kaya asam nukleat yang banyak membawa muatan negatif dalam bentuk gugus posfat, sehingga akan berikatan dengan pewarna basa yang bermuatan positif (Brooks et al, 2004).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian Penggunaan Ekstrak Kombinasi Angkak Dan Daun Jati Sebagai Pewarna Penutup Pada Pewarnaan Gram dapat disimpulkan bahwa ekstrak kombinasi angkak dan daun jati dapat digunakan sebagai alternatif pewarna penutup pada pewarnaan Gram namun masih

memerlukan penelitian lanjutan untuk menyempurnakan formulasinya

## DAFTAR PUSTAKA

- Ati, N.H., Rahayu, P., Notosoedarmo, S. dan Limantara L. 2006. The Composition and The Content of Pigment some Dyeing Plant for Ikat Weaving in Timoresse Regency, East Nusa Tenggara. Indones. J. Chem. Vol 6 (3) : 325– 331.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., and Morse, S. A. 2004. Jawetz, Melnick, & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta.
- Dash, S., Patel, S., Mishra, B. 2009. Oxidation by Permanganate : Syntetic and Mechanistic Aspect. Tetrahedron. Vol 65(859) : 707-739.
- Ekawati, P., Rostiati & Syahraeni. 2015. Aplikasi ekstrak kulit buah naga sebagai pewarna alami pada susu kedelai . e-J. Agrotekbis. Vol: 3(2):198-205 .
- Farida, R&Nisa, F. C. 2015. Ekstraksi Antosianin Limbah Kulit Manggis Metode Microwave Aasisted extration ( Lama Ekstraksi dan Rasio Bahan Pelarut). Vol. 3(2) : 362-373.
- Hafiz, H., Chukwu, O. O. C., Nura, S. The Potentials of Henna (Lawsonia inamis L.) Leaves Extract as Counter Stain in Gram Staining Reaction. Bayero Journal of Pure and Applied Science. Vol. 5(2): 56-60.
- Harley, J. P. & Prescott, L. M. 2002. Laboratory Exercise in Microbiology. McGraw-Hill Company.
- Luciana, C. 2016. Pemanfaatan Kombinasi Angkak dan Daun Jati sebagai Pewarna pada Pewarnaan Bakteri. Karya Tulis Ilmiah (Tidak dipublikasikan). Prodi DIII Analis Kesehatan. STIKes Bakti Tunas Husada. Tasikmalaya.
- Ma, J., Y. Li, Q. Ye, J. Li, Y. Hua, D. Ju, D. Zhang, R. Cooper, and M. Chang. 2000. Constituents of Red Yeast Rice, a Traditional Chinese Food and Medicine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 5220-5225.
- Pelczar. M. J., dan Chan, E. C. S. 2009. *Dasar – dasar Mikrobiologi Jjilid 1*. UI Press. Jakarta. 2009.
- Pratama, Y. 2013. Pemanfaatan Ekstrak Daun Jati ( *Tectona grandis lin. F.*) Sebagai Indikator Titrasi Asam Basa. Skripsi (tidak dipublikasikan). Jurusan Kimia. Fakultas MIFA. Universitas Negeri Semarang.
- Radiastuti, N. 2005. Produksi Pekatan dan Kristal Pigmen oleh *Monascus purpureus* TSTR 3090 sebagai Pewarna Merah Alami Makanan dan Minuman serta Stabilitas Selama Penyimpanan. Laporan Hasil Penelitian (tidak dipublikasikan). Lembaga

- penelitian UIN Syarif Hidayatullah.  
Jakarta.
- Rosyida, A dan Achadi, D. 2014.  
Pemanfaatan daun jati muda untuk  
pewarnaan kain kapas pada suhu  
kamar. *Arena tekstil*. Vol 29(2) :  
115-122.
- Suwanto, A. 1985. Produksi angkak  
sebagai zat pewarna makanan.  
*Media Teknologi dan Pangan* . Vol 1  
(2). Hal :8-14.
- Syarfi. 2013. Pembuatan Zat Warna Alami  
dar Kunyit dengan Membran  
Ultrafiltrasi. *Jurnal Teknobiologi*.  
Vol IV(1): 29-33.
- Wijayakusuma, H. 2008. *Ramuan herbal  
penurun kolesterol*. 2008. Pustaka  
bunda. Depok.
- Winarti, S, Sarofa, U dan Anggrahini, D.  
2008. Ekstraksi dan Stabilitas  
Warna Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea  
batatas L.*) sebagai Pewarna Alami.  
*Jurnal Teknik Kimia*. Vol. 3(1) :  
207-214.